

Poster P.18.117

DEFINING HEMATOPOIESIS IN BETA-THALASSEMIA PATIENTS AND AFTER GENE THERAPY

Lidonnici M.R.*^[1], Scaramuzza S.^[1], Rossi C.^[1], Tiboni F.^[1], Ciceri F.^[2], Aiuti A.^[3], Marktel S.^[2], Ferrari G.^[1]

^[1]San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[2]Haematology and BMT Unit IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, ^[3]Pediatric Immunohematology IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Beta-thalassemia (Bthal) is a genetic disorder due to mutations in the β -globin gene, leading to a reduced or absent production of HbA, which interferes with erythroid cell maturation and limits red cell production. Patients are affected by severe anemia, hepatosplenomegaly, and skeletal abnormalities due to rapid expansion of the erythroid compartment in bone marrow (BM) caused by ineffective erythropoiesis. In a classical view of hematopoiesis, the blood cell lineages arise via a hierarchical scheme starting with multipotent stem cells that become increasingly restricted in their differentiation potential through oligopotent and then unipotent progenitors. Recently, purification strategies based on differential expression of CD49f and CD90 surface molecules enrich for long-term (CD49f+) and short-term (CD49f-) repopulating hematopoietic stem cells (HSCs), with distinct cell cycle properties, but similar myeloid (My) and lymphoid potential. Recent work has proposed that erythroid (Ery) and megakaryocytic (Mk) fates branch off directly from CD49f- cells. A general perturbed and stress condition is present in the thalassemic BM microenvironment, which is expected to have impact not only on erythropoiesis but also on hematopoiesis. Thus, to address which model of hematopoiesis/erythropoiesis occurs in Bthal, we defined by immunophenotype analysis the lineage commitment in patients affected by the pathology compared to healthy donors. Furthermore, in patients treated in the therapy protocol TIGET BTHAL (#NCT02453477) this type of analysis allowed to study the features of reconstituted hemato/erythropoiesis by gene-modified transplanted CD34+ cells. Initial results showed differences in the primitive compartment with an increased proportion of multipotent progenitors in Bthal patients compared to healthy donors. We were also able to unveil age-related differences, thanks to the availability of adult and pediatric subjects' samples. By subjecting the classically defined progenitor subsets to a new cell sorting scheme, that efficiently resolved My, Ery, and Mk lineage fates, we quantified the newly identified My and Ery subsets within the CD34+CD38+ compartment and found a reduction of Ery subsets in Bthal samples. Moreover, in gene therapy treated patients we found fluctuations in the contribution of HSC and MPP to the hematopoiesis during follow up. Future RNA-seq analysis, performed on HSC and derived progenitors, will delineate the transcriptional networks governing hematopoiesis in thalassemia.

Studio dell'emopoiesi in pazienti talassemici e dopo terapia genica

Beta-talassemia (Bthal) è una malattia genetica dovuta a mutazioni nel gene beta-globina, che porta una ridotta o assente produzione di HbA, che interferisce con la maturazione delle cellule eritroidi e produzione di globuli rossi. I pazienti sono affetti da grave anemia, epatosplenomegalia e anomalie scheletriche a causa della rapida espansione del compartimento eritroide nel midollo osseo dovuta a eritropoiesi inefficace. Nella visione classica dell'ematopoiesi, le cellule del sangue vengono prodotte, attraverso uno schema gerarchico, a partire da cellule staminali multipotenti che diventano sempre più limitate nel loro potenziale di differenziamento attraverso progenitori oligopotenti e poi unipotenti. Recentemente, strategie di purificazione basate sull'espressione differenziale di molecole di superficie CD49f e CD90 sono in grado di isolare cellule staminali ematopoietiche (CSE) con capacità ripopolante a lungo termine (CD49f+) e a breve termine (CD49f-), con proprietà diverse nel ciclo cellulare, ma stesso potenziale di differenziamento mieloide (My) che linfoide. Recenti lavori hanno

proposto che i "lineages" eritroide (Ery) e megakaryocitico (Mk) derivino direttamente dalle CSE 49f+. Il midollo osseo dei pazienti affetti da questa malattia è caratterizzato da una condizione perturbata e da stress il cui impatto sull' eritropoiesi è risaputo, mentre sull'ematopoiesi è per lo più sconosciuto. Col fine di poter delineare il modello gerarchico ematopoietico in talassemia, abbiamo definito, mediante analisi immunofenotipica, il processo di differenziamento nei diversi "lineages" maturativi sia in pazienti affetti da questa patologia che in donatori sani. Inoltre, questo tipo di analisi è stata effettuata nei pazienti trattati in un protocollo di terapia genica (TIGET-BTHAL, #NCT02453477) e ci ha permesso di studiare la ricostituzione ematopoietica delle cellule CD34+ trasdotte trapiantate. Risultati preliminari hanno mostrato differenze nel compartimento staminale con una maggiore percentuale di progenitori multipotenti nei pazienti talassemici rispetto ai donatori sani. Siamo stati anche in grado di valutare differenze legate all'età, grazie alla disponibilità di campioni di soggetti adulti e pediatrici. Analizzando i progenitori ematopoietici con un nuovo schema di "sorting" in grado di risolvere in modo efficiente il differenziamento My, Ery e Mk, abbiamo quantificato nuovi progenitori My ed Ery all'interno del compartimento CD34+CD38+ e abbiamo trovato una riduzione delle popolazioni Ery nei campioni Bthal. Inoltre, nei pazienti trattati con la terapia genica sono state osservate fluttuazioni nel contributo di CSE e MPP all'ematopoiesi durante il follow-up. In futuro, analisi di RNA-seq eseguita su CSE e sui progenitori delineerà i processi trascrizionali che governano l'ematopoiesi in talassemia.

no

Beta-Talassemia

Coordinator: Giuliana Ferrari

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

TGT16A04

Disease Name:

Beta-Thalassemia

Keywords:

thalassemia, hematopoietic stem cells, erythropoiesis